

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PRESENTES NOS OVOS DO CARRAPATO *Boophilus microplus*, VIA ESPECTROFOTOMETRIA PELO MÉTODO DE BRADFORD

TAMIRES DE LIMA SOUZA¹

MARCELO DE PAIVA BECHTLUFFT²

RESUMO:

Os ovos do carrapato *Boophilus microplus* apresentam um perfil de proteínas bastante heterogêneo, onde aparecem tanto moléculas com alto peso molecular quanto de baixo peso. Este trabalho teve como objetivo quantificar as proteínas presentes nos ovos dos carrapatos *Boophilus microplus*, que podem ser imunogênicas. Usando o método de Bradford, é possível quantificar essas macromoléculas de modo mais específico, rápido e mais sensível, que facilita futuros trabalhos. Com o resultado obtido para as amostras de ovos de *Boophilus microplus*, pode-se observar uma alta correlação linear de Pearson ($R^2 = 0,9842$) na faixa de 0,5 a 5mg/mL. Esse valor é próximo de 1, que representa reta linear. Conhecer essas proteínas pode ser bastante eficiente no estudo prévio para fabricação da vacina contra a doença Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que é responsável por grande prejuízo no Brasil e no mundo.

PALAVRAS-CHAVE: Bradford. Dosagem de proteínas. *Boophilus microplus*.

ABSTRACT:

The eggs of *Boophilus microplus*, have a heterogeneous profile of proteins which appear both molecules with high molecular weight as underweight. This study aimed to quantify the proteins in eggs of *Boophilus microplus* ticks, which can be immunogenic. Using the method of Bradford, it is possible to quantify these macromolecules more specifically,

¹ Graduada em Ciências Biológicas pela FAPAM.

² Orientador e Professor de Genética, Bioquímica e Imunologia do Curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Pará de Minas – FAPAM. E-mail: marcelopaiva@parademinas.com.br

faster and more sensitive facilitating future work. With the result obtained for the samples of eggs *Boophilus microplus*, one can observe a high linear correlation coefficient ($R^2 = 0.9842$) in the range of 0.5 to 5 mg/mL. This value is close to 1, which represents a straight linear. Knowing these proteins can be quite effective in a previous study to manufacture the vaccine against bovine babesiosis disease (TPB), which is responsible for much prejudice in Brazil and worldwide.

KEYWORDS: Bradford. Proteins content. *Boophilus microplus*.

1 INTRODUÇÃO:

Atividades de pesquisa com proteínas, como caracterização e purificação, exigem que se utilize um método preciso e rápido que quantifique as proteínas. Utilizando o reagente de Bradford, consegue-se preencher esses requisitos, pois é um reagente que tem em sua composição “Coomassie brilliant blue” que interage com macromoléculas e proteínas que possuem aminoácidos com cadeias laterais básicas ou aromáticas (ZAI, 1998). Esse método é baseado na complexação do corante com cadeia polipeptídica.

Os organismos são constituídos de proteínas de vários tamanhos e especificidades. Quando observados em eletroforese, os ovos do carrapato *Boophilus microplus* apresentam um perfil bastante heterogêneo, com presença de moléculas de alto peso molecular e de baixo peso.

Este trabalho teve como objetivo quantificar as proteínas presentes nos ovos dos carrapatos *Boophilus microplus*, que podem ser imunogênicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras

Os primeiros testes foram para a curva padrão da ovalbumina. Uma solução-mãe foi preparada usando tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e um ovo de galinha, de onde foi separada a clara manualmente e a gema descartada.

Sabendo-se que a Ovoalbumina representa 54% das proteínas da clara e possui uma massa molar de 45 Kg/mol (SOUSA, 2008), foram pesadas 10 g da clara e adicionadas a 100 ml de tampão Tris HCl, 1,5 M, pH 8,8. O tampão foi preparado utilizando-se 36,342 g do sal Tris para 200mL de solução, acertando pH final com ácido clorídrico (HCl).

A partir da solução-mãe (10 mg/mL) foram preparadas seis diluições com as concentrações finais: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL. Em eppendorfs à parte, foram separados 10 µL de cada concentração final e adicionados a 790 µL de água e 200 µL de Reagente de Bradford formando soluções de 1 mL, como amostras finais para a leitura no espectrofotômetro.

O primeiro teste foi feito para calcular a absorbância e a quantidade de proteínas, usando a solução-mãe preparada e ovo de *Boophilus microplus*. As amostras foram medidas em espectrofotômetro, com comprimento de luz de 595 nm, luz visível, usando água para o Branco. As porções foram lidas em triplicata, ou seja, foram feitas três leituras, cada uma com 1 mL e, dos valores obtidos, tirou-se uma média de absorbância.

O extrato bruto de ovos de *Boophilus microplus* também foi dosado pelo método de Bradford. A solução-mãe foi preparada usando 10 µL de extrato bruto em 990 µL de Tris 1,5 M, pH 8,8, para uma concentração final de 10 mg/mL.

A partir da solução-mãe foram preparadas concentrações: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL. Seguindo essas concentrações, foram preparadas, em eppendorfs, as amostras para leitura e comparação com a curva de ovalbumina.

A solução pura de ovos de *Boophilus microplus* foi diluída em proporção 10:1000, onde 10 µL da amostra bruta foi diluída em 990 µL de Tampão Tris-HCl pH 8,8. Retirou-se 1 ml desta solução para ser lida no espectrofotômetro no método simples.

Outro teste posterior de quantificação de proteínas foi feito usando o método de Bradford. Usou-se 10 µL da solução-mãe da Ovoalbumina do ovo de galinha, 790 µL de água destilada e 200 µL de Reagente de Bradford. Também de forma triplicada, obteve-se uma média de absorbância (Y), com comprimento de onda de 595 nm.

Da solução de extrato cru dos ovos do carrapato, usou-se 10 μL , 790 μL de água destilada e 200 μL de Reagente de Bradford. A absorbância foi lida e calculada a quantidade de proteínas por mg/mol. É um método frequentemente utilizado em laboratório, por ser rápido e sensível, com poucos agentes interferentes (BRIGIDO, 2003).

O reagente de Bradford é preparado com 100 mg de Cromasse Blue G-250 dissolvido em 50 mL de etanol 95%. Nessa solução, adiciona-se 100 mL de ácido fosfórico comercial concentrado, completando com água até um volume final de 200 mL (BRIGIDO, 2003).

As proteínas podem ser quantificadas por vários métodos espectrofotométricos. É uma maneira de se conhecer a quantidade de proteínas com que se está trabalhando, além de ser vantajoso por permitir o reaproveitamento das amostras. A principal desvantagem é a possível interferência de outros compostos, que geralmente contaminam a amostra, mas são poucos esses agentes de interferência.

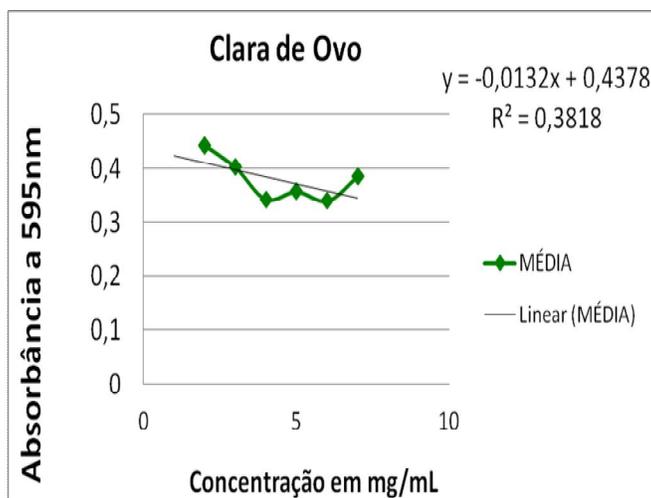
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de proteínas realizada pelo método de Bradford demonstrou que, nas amostras de ovalbumina, lidas em triplicata, obtiveram uma média decrescente, de acordo com o decréscimo da concentração de proteínas na solução de leitura.

A leitura foi feita em espectrofotômetro FEMTO, 700S, com comprimento de onda $\lambda = 595 \text{ nm}$, utilizando a água como o branco. A cubeta foi lavada com álcool 70% e água destilada a cada troca de amostras com concentração diferente com objetivo de evitar a contaminação de amostras diferentes.

A primeira dosagem foi feita para estudos de elaboração da curva de clara de ovo, mas essa apresentou interferentes. As concentrações dosadas foram: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL. Amostras: 200 μL de reagente Bradford, 790 μL de Tris HCl pH 7,5 e 10 μL da amostra.

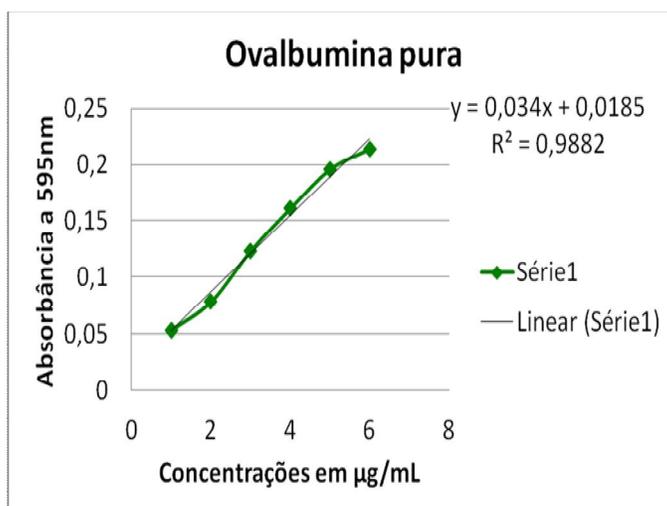
FIGURA 1- Primeira dosagem, usando amostras de clara de ovo. Essa apresentou interferentes mostrados no $R^2 = 0,3818$.



Fonte: dados coletados pelos autores.

Em seguida, na tentativa de eliminar todos os interferentes encontrados na clara de ovo, as concentrações 20 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 5,0 $\mu\text{g/mL}$; 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 2,0 $\mu\text{g/mL}$ foram lidas da albumina purificada.

FIGURA 2 – Elaboração da curva padrão de albumina. $R^2 = 0,9882$

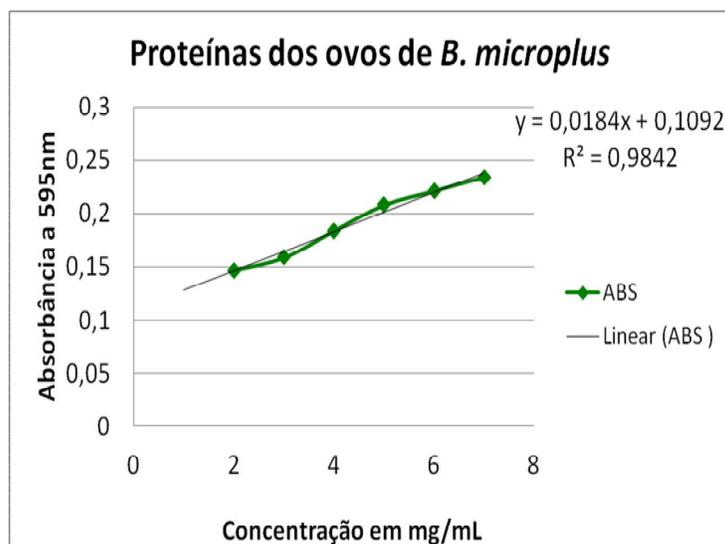


Fonte: dados coletados pelos autores.

Essa dosagem foi feita para elaboração da curva padrão de Ovalbumina, com finalidade de quantificação de proteínas nos ovos de *B. microplus*.

Para a dosagem e quantificação das proteínas dos ovos de *B. microplus*, as concentrações lidas no espectrofotômetro foram: 20 µg/mL; 15 µg/mL; 10 µg/mL; 5,0 µg/mL; 2,5 µg/mL, 2,0 µg/mL. Amostras: 200 µL de reagente Bradford, 780 µL de Tris HCl pH 7,5 e 20 µL da amostra.

FIGURA 3- Dosagem feita para conhecimento da linearidade na leitura de ovos de *B. microplus*. $R^2 = 0,9842$



Fonte: dados coletados pelos autores.

O quadro abaixo mostra as respectivas absorbâncias obtidas na leitura das proteínas dos ovos do carrapato. Esses valores (média) foram plotados no gráfico para obtenção do R^2 .

QUADRO 1 – Absorbâncias obtidas na leitura dos ovos do carrapato

Amostra	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média
2µg/mL	0,201	0,193	0,216	0,203333
6µg/mL	0,225	0,246	0,225	0,232
10µg/mL	0,229	0,27	0,235	0,244667

Fonte: dados coletados pelos autores.

Todos os resultados obtidos foram plotados em um gráfico com as médias, traçados em Microsoft Office Excel 2007, que também foi utilizado na aplicação das equações da reta e no cálculo do valor do coeficiente de correlação de Pearson (R^2 ou r).

Com os valores de R^2 da equação da reta obtida, foi possível determinar a concentração de proteínas provenientes em amostras obtidas dos ovos do parasita.

3.1 Cálculo da quantificação

Sabendo dos valores da média, as concentrações utilizadas e a curva padrão de Ovalbumina, os cálculos foram feitos com a equação:

$$y = 0,034x + 0,0185$$

Onde y = Absorbância; x = Concentração da amostra; a = Coeficiente angular da reta e b = Coeficiente linear da reta.

Para a amostra cuja concentração é 2 µg/mL, o cálculo indicou 5,4352 µg/mL de proteínas. Para concentração 6 µg/mL, foram calculadas, 6,2794 µg/mL de proteínas e para concentração de 10 µg/mL, foram encontradas 6,65 µg/mL de proteínas.

Conhecendo esses resultados, é possível calcular, através de regra de três, e saber que são encontradas aproximadamente 1,0465 µg/mL de proteínas em porções de 1 µg/mL de solução de extrato bruto de ovos do carrapato *Boophilus microplus*. Mas esses valores estão sujeitos a mudanças, devido a possíveis interferências no momento da dosagem e por se tratar de ovos de carrapato com várias moléculas diferentes.

REFERÊNCIAS:

BERG, Jeremy M; TYMOCZKO, John L; STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan,2004.

SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual** / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edition, vol. 1. 1989.

SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual** / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edition, vol. 2. 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual** / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edition, vol. 3. 1989.

SILVEIRA, Gustavo Luis Lopes. **Identificação de Proteínas com expressão induzida por choque térmico em *Herbaspirillum seropedicae***. Universidade Federal do Paraná. Curitiba:2009.

SOUSA,Rita de Cássia Superbi de. **Separação da lisozima, conalbumina ovalbumina presentes na clara do ovo: aspectos tecnológicos e termodinâmicos**. TEDE- Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFV. Viçosa, MG, 2008

ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thaís B. V. and LICHTIG, Jaim. **Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes.** *Quím. Nova* [online]. 1998, vol.21, n.6, pp. 787-793. ISSN 0100-4042.